

薬剤誘発性心電図異常に対するコモンマーモセットを用いたヒト予測性に関する研究

著者	渡辺 健太
著者別表示	Watanabe Kenta
雑誌名	博士論文要旨Abstract
学位授与番号	13301甲第4985号
学位名	博士（創薬科学）
学位授与年月日	2019-09-26
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059277

doi: <https://doi.org/10.2131/jts.44.441>



氏 名	渡辺 健太
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	医薬保博甲 305 号
学位授与の日付	令和元年 9 月 26 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	薬剤誘発性心電図異常に対するコモンマーモセットを用いたヒト 予測性に関する研究

論 文 審 査 委 員	主査	金田 勝幸
	副査	石崎 純子
	副査	若杉 光生
	副査	後藤（中川） 享子
	副査	檜井 栄一

學位論文要旨

Abstract

The objective of this study is to assess the response of telemetered common marmosets to multiple cardiac ion channel inhibitors and to clarify the usefulness of this animal model in evaluating the effects of drug candidates on electrocardiogram (ECG). Six multiple cardiac ion channel inhibitors (sotalol, astemizole, flecainide, quinidine, verapamil and terfenadine) were orally administered to telemetered common marmosets and changes in QTc, PR interval and QRS duration were evaluated. Drugs plasma levels were determined to compare the sensitivity in common marmosets to that in human. QTc prolongation was observed in the marmosets dosed with sotalol, astemizole, flecainide, quinidine, verapamil and terfenadine. PR prolongation was noted after flecainide and verapamil administration, and QRS widening occurred following treatment with flecainide and quinidine. Drugs plasma levels associated with ECG changes in marmosets were similar to those in human, except for astemizole- and verapamil-induced QTc prolongation. Verapamil-induced change is suggested due to body temperature decrease, and sensitivity to astemizole-induced change in marmosets is considered similar with that in dogs and monkeys. These results indicate that telemetered common marmoset is a useful animal model for evaluation of the ECG effects of drug candidates although the influence of body temperature change should be considered.

本論

薬剤性不整脈は重篤な副作用の一つであり、医薬品の開発中止に直結するだけでなく、被検者や患者の生命を脅かす。そのため、催不整脈リスクを創薬早期に精度高く評価することが期待されており、これまで様々な非臨床催不整脈性評価系が開発されてきた。In vitro および ex vivo 評価系は、より少量の被験物質でリスク評価可能な点で優れており、現在、それらの評価結果からヒト心電図に及ぼす影響を予測する in silico 評価系の開発が進められている。しかしながら、心電図は自律神経系やホルモン、体温の影響などを受け、また薬剤の影響はその体内動態や代謝物の性質によっても異なるため、薬剤の総合的な催不整脈リスク評価のために in vivo 評価は必須である。ビーグルイヌやカニクイサルを用いたテレメトリー試験の結果はヒト外挿性が高いと考えられており、規制当局からも実施が求められる試験である。しかしながら、これらの動物は体格が大きく、当該試験実施のために多量の被験物質が必要であるため、創薬初期での試験実施は困難である。心電図評価は、ヒト外挿性の観点から非齧歯動物を用いることが望ましいため、一般的に毒性評価に使用されるラットなどの齧歯動物は心電図評価には不適である。この課題を解決する手段として、より小型なサルであるコモンマーモセットの in vivo 心電図評価への応用が期待されている。コモンマーモセットはラットと同程度の体格であり、これまでに human ether-a-go-go-related gene (hERG)チャネル阻害による QTc 延長に関して、良好な反応性が報告されている。しかしながら、複数の心筋イオンチャネル阻害能を有する薬剤（マルチ心筋イオンチャネル阻害剤）に対する反応性は検討されていないことから、実際にそのような化合物群の評価が必要な創薬研究における心電図評価でのコモンマーモセットの有用性には不明な点が残る。そこで今回、コモンマーモセットのマルチ心筋イオンチャネル阻害薬に対する反応性を明らかにし、またそのヒト心電図に及ぼす影響に対する予測性を明らかにすることで、コモンマーモセットの創薬研究における心電図評価での有用性を検討することを目的として研究を行った。

1. コモンマーモセット心電図パラメータの日内変動および個体差

まず、覚醒無拘束下コモンマーモセットの心電図パラメータの特性を検討した。延べ 18 頭のコモンマーモセットから得た媒体経口投与後の心電図パラメータ値の推移 (Table 1) から、全ての心電図パラメータ (PR 間隔、QRS 幅、QTc) に顕著な日内変動がないことが確認された。一方、全ての心電図パラメータにおいて個体差に起因する大きなばらつきが認められ、そのばらつきは投与前値からの変化量 (Δ 値) の方が絶対値より小さかった。 Δ 値は、より高精度に薬剤の心電図パラメータに対する作用を評価可能な代表値であると考えられたため、以降の薬剤評価においては測定値に加え、 Δ 値も用いた。

Table 1 Variations in PR interval, QRS duration and QTc in measured absolute value (A) and change from pre-value (B) in conscious common marmoset

(A) Absolute value									(B) Change from pre-value (Δ value)								
PR(msec)									PR(msec)								
Time after dosing (hr)									Time after dosing (hr)								
Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total	Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total
N	18	18	18	18	15	3	18	108	N	0	18	18	18	15	3	18	90
Mean	50	50	50	50	51	52	51	50	Mean	-	0	0	0	1	1	0	0
S.D.	4	4	5	5	5	7	5	5	S.D.	-	2	2	2	2	1	2	2
Max	56	56	57	57	55	58	56	58	Max	-	5	3	3	6	2	6	6
Min	42	43	41	40	40	45	41	40	Min	-	-3	-3	-3	-3	0	-4	-4
QRS(msec)									QRS(msec)								
Time after dosing (hr)									Time after dosing (hr)								
Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total	Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total
N	18	18	18	18	15	3	18	108	N	0	18	18	18	15	3	18	90
Mean	27	26	27	26	27	24	27	27	Mean	-	0	0	0	0	0	0	0
S.D.	2	2	2	2	2	3	3	2	S.D.	-	1	1	1	1	1	1	1
Max	29	29	29	29	30	27	29	30	Max	-	2	2	1	1	1	2	2
Min	22	22	21	22	21	21	20	20	Min	-	-1	-1	-1	-1	-1	-2	-2
QTc(msec)									QTc(msec)								
Time after dosing (hr)									Time after dosing (hr)								
Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total	Time	Pre	1	2	4	6	8	24	Total
N	18	18	18	18	15	3	18	108	N	-	18	18	18	15	3	18	90
Mean	146	144	145	143	148	143	148	145	Mean	-	-2	-1	-3	1	0	2	-1
S.D.	11	11	13	12	13	10	14	12	S.D.	-	4	5	4	5	7	6	5
Max	172	163	171	165	180	150	188	188	Max	-	4	5	4	9	8	16	16
Min	123	115	115	117	132	131	133	115	Min	-	-10	-10	-10	-6	-6	-9	-10

All the vehicle control data (from 18 common marmosets) were aggregated at each time point.

2. コモンマーモセットの心電図パラメータに対するマルチ心筋イオンチャネル阻害薬の作用

コモンマーモセットのマルチ心筋イオンチャネル阻害薬に対する反応性を検討するため、マルチ心筋イオンチャネル阻害剤 6 薬剤をコモンマーモセットにそれぞれ経口投与し、心電図パラメータの変化を評価した。また、サテライト動物を用いて血中被験物質濃度推移を評価した。使用したマルチ心筋イオンチャネル阻害剤とその心筋イオンチャネル阻害能および評価時点を示す (Table 2)。

Table 2 Molecular weight, cardiac ion channel inhibitory potential and time points for ECG parameters determination and TK assessment of test articles.

Test article	Molecular weight	IC ₅₀ (μM)			Time points (hr post-dose)	
		hERG	Cav1.2	Nav1.5	ECG parameter determination	Plasma exposure measurement
Sotalol	272.4	111.4	193.3	7013.9	1, 2, 4, 8, 24	1, 2, 4, 8
Astemizole	458.6	0.0009	1.1	3.0	1, 2, 4, 6, 24	1, 2, 4, 6
Desmethylastemizole	444.5	0.001	N.D.	N.D.		
Flecainide	414.3	1.5	27.1	6.2	1, 2, 4, 6, 24	1, 2, 4
Quinidine	324.4	0.72	6.4	14.6	1, 2, 4, 6, 24	1, 2, 4, 6
Verapamil	454.6	0.25	0.20	32.5	1, 2, 4, 6, 24	1, 2, 4, 6
Terfenadine	471.7	0.0191	0.93	2.0	1, 2, 4, 6, 24	1, 2, 4, 6

いずれの化合物もコモンマーモセットにおいて心電図異常を生じた。Sotalol は QTc 延長を、astemizole は QTc 延長を、flecainide は PR 延長、QRS 延長および QTc 延長を、quinidine は QRS 延長および QTc 延長を、verapamil は PR 延長および QTc 延長を、terfenadine は QTc 延長を引き起こした (Figure 1)。いずれの変化も絶対値を用いた評価より Δ 値を用いた評価の方がより低濃度、あるいはより多くの評価時点で検出された (Table 3)。Verapamil の QTc 延長以外の変化は臨床においても報告されており、また、コモンマーモセットにおいて変化が認められなかった心電図パラメータは臨床においても報告がない。Verapamil 投与後の QTc 延長は体温低下と良く相関していたため (Figure 2)、この変化は体温低下に伴う二次的な影響であると考えられた。体温低下による QTc 延長はヒトやイヌにおいて報告されている。また、体温低下の感受性には種差や個体差があることが報告されており、体表面積/体重比の大きい、小型な動物で生じやすい。従って、これらがヒトでは報告のない verapamil 投与後の QTc 延長が、ヒト、ビーグルイヌ、カニクイサルと比較して体重が 1/200-1/10 程度のであるコモンマーモセットにおいてのみ認められた原因であると考えられた。以上の結果より、体温低下による二次的な影響を除いて、6 種のマルチ心筋イオンチャネル阻害剤のヒト心電図に対する作用がコモンマーモセットにおいても同様に検出されたと考えられた。

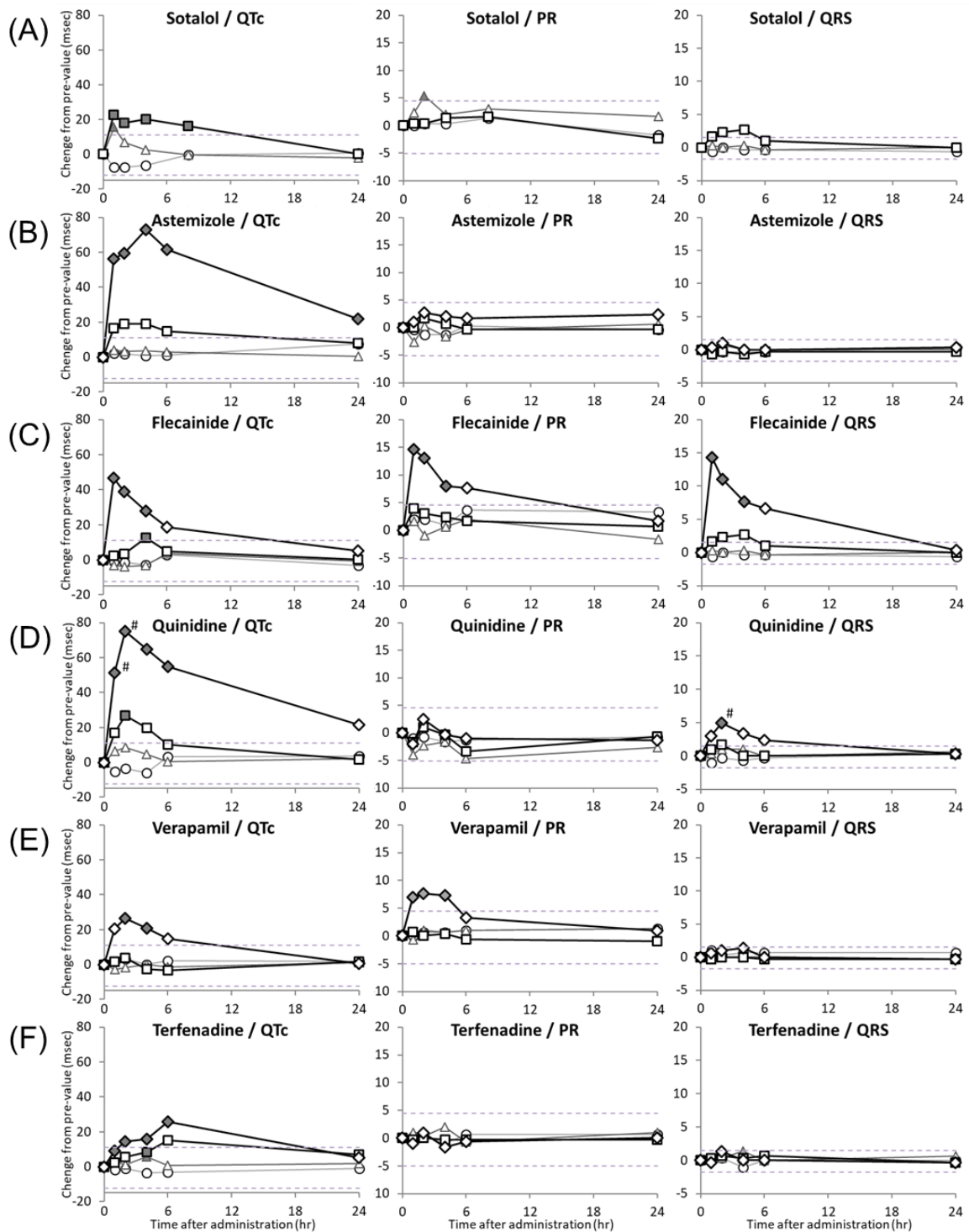


Figure 1 Effects of sotalol (A), astemizole (B), flecainide (C), quinidine (D), verapamil (E) and terfenadine (F) on ECG parameters in conscious common marmoset.

Time course of ECG parameters after oral administration of sotalol, astemizole, flecainide, quinidine, verapamil and terfenadine are shown in change from pre-value. The closed symbols represent statistically significant changes from the corresponding vehicle control value ($p < 0.05$, compared with the vehicle-treated data). #: Judged to be significant and the symbols were filled since the changes noted in 2 common marmosets exceeded the range of any vehicle control data, although the statistical analysis was not conducted. Data are presented as mean.

Table 3 Summary of the change in ECG parameters induced by multiple cardiac channel inhibitors in common marmoset.

Test article	ECG parameter	LOEL (mg/kg)		Number of time points at which ECG change was noted	
		A	Δ	A	Δ
Sotalol	QTc	-	15	0	5
Astemizole	QTc	30	30	3	4
Flecainide	QTc	45	15	3	4
	PR	45	45	2	3
	QRS	45	45	3	3
Quinidine	QTc	50	10	4	5
	QRS	50	50	2	1
Verapamil	QTc	150	150	2	2
	PR	-	150	0	3
Terfenadine	QTc	100	30	5	6

The lowest observed effect level for ECG parameter change by each test article and the number of time points at which change in ECG parameter was noted are summarized. LOEL: the lowest observed effect level. A: Absolute value. Δ : Change from pre-value.

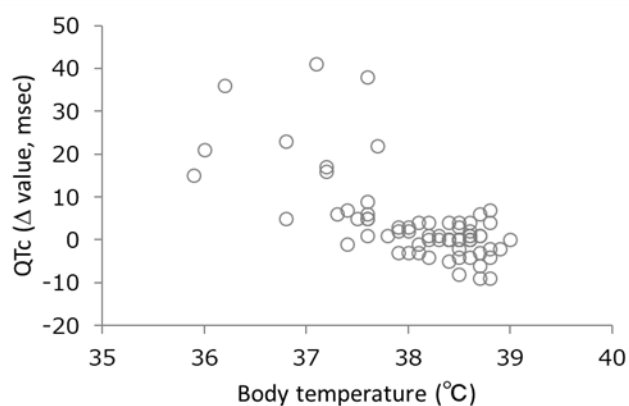


Figure 2 Relationship between changes in body temperature and QTc after oral administration of verapamil.

The relationship between QTc and body temperature after oral administration of verapamil is shown. Individual common marmoset data at all the ECG evaluation time points are plotted.

3. マルチ心筋イオンチャネル阻害剤による心電図異常の感受性比較

各マルチ心筋イオンチャネル阻害剤のコモンマーモセット血清中タンパク結合率を測定し、心電図パラメータ変化および血漿中被験物質濃度推移のデータから、各心電図パラメータに対する最小作用量 (LOEL) における非結合型 C_{\max} を算出した。また、ヒト、ビーグルイヌおよびカニクイサル各心電図パラメータに対する LOEL における非結合型 C_{\max} について、臨床情報や文献を調査した。その結果を Table 4 に示す。心電図異常発現時の非結合型血中濃度は、コモンマーモセットとヒトにおいて、astemizole による QTc 延長および verapamil による QTc 延長を除く全ての心電図変化が同等の血中曝露下 (4 倍以内の乖離) で認められていることが確認された。Astemizole の QTc 延長はヒトよりコモンマーモセットの方が高曝露下でないと検出されていなかった (14.5 倍以上の乖離)。Astemizole 投与後の QTc 延長には、同等の hERG 阻害活性を持つ代謝物 desmethylastemizole の関与が示唆されており、Table 5 に示す通り、コモンマーモセット、ヒト、ビーグルイヌ、カニクイサルの各種において QTc 延長が認められた際にも血漿中に astemizole と同等以上の desmethylastemizole が検出されている。Astemizole と desmethylastemizole の合算の総濃度で比較すると、コモンマーモセットとヒトではやはり 10 倍以上の乖離があることから、astemizole による QTc 延長に関しては種差が存在する可能性が示唆された。しかしながら、ビーグルイヌおよびカニクイサルとの比較においては大きな差はなかったことから、コモンマーモセットは一般に非臨床評価に用いられるこれらの動物種と同程度の感受性を持つと考えられた。

Table 4 Plasma unbound levels of sotalol, astemizole, flecainide, quinidine, verapamil and terfenadine, at which ECG parameter changes were noted or reported in common marmoset, beagle dog, cynomolgus monkey, and human

Test article	Changed ECG parameter	Plasma levels showing the ECG changes (ng/mL)			Ratio		Reference
		CM	H	D & M	CM / H	CM / D & M	
Sotalol	QTc prolongation	3875	1008 - 2996	(D) 3073	1.3 - 3.8	1.3	H: Redfern, <i>et al.</i> , 2003 H: Gotta, <i>et al.</i> , 2016 D: Herbert, <i>et al.</i> , 2011
Astemizole	QTc prolongation	0.247	<0.0165	N.A.	>14.5	N.C.	H: Redfern, <i>et al.</i> , 2003 H: Vorperian, <i>et al.</i> , 1996 D: Toyoshima, <i>et al.</i> , 2005 M: Ando, <i>et al.</i> , 2005
Flecainide	QTc prolongation	625	660	N.D.	1	N.C.	H: Salerno, <i>et al.</i> , 1986 H: Bergenholm, <i>et al.</i> , 2017 D: Herbert, <i>et al.</i> , 2011
	PR prolongation	1838	669	(D) 996	2.7	1.8	
	QRS widening	1838	669	(D) 256	2.7	7.2	
Quinidine	QTc prolongation	163	97-224	(D) 395 (M) 166	0.7 - 1.7	0.4 - 1.0	H: Redfern, <i>et al.</i> , 2003 H: Bergenholm, <i>et al.</i> , 2017 D: Toyoshima, <i>et al.</i> , 2005 D: Cros, <i>et al.</i> , 2012
	QRS widening	240	599	(D) 908 (M) N.D.	0.4	0.3	M: Ando, <i>et al.</i> , 2005a M: Akabane, <i>et al.</i> , 2010
Verapamil	QTc prolongation	45	N.A.	N.D.	N.C.	N.C.	H: Bergenholm, <i>et al.</i> , 2017 D: Herbert, <i>et al.</i> , 2011 M: Ando, <i>et al.</i> , 2005
	PR prolongation	45	94	(D) 17.6 (M) N.D.	0.5	2.6	
Terfenadine	QTc prolongation	0.05	0.09	(D) 6.52 (M) N.A.	0.6	0.008	H: Redfern, <i>et al.</i> , 2003 D: Van Deuren, <i>et al.</i> , 2009 D: Webster, <i>et al.</i> , 2001 M: Ando, <i>et al.</i> , 2005

Data for common marmosets are based on the results of this study. Data for beagle dog, cynomolgus monkeys and human are reported in the literature. N.A.: Not available due to a lack of protein binding ratio data. N.D.: Not detected even at the highest dose. N.C.: Not calculated. CM: Common marmoset, H: Human, D: Dog, M: Monkey.

Table 5 Plasma concentration of astemizole and desmethylastemizole at QTc prolonged dose in human, common marmoset, monkey and dog.

Species	Unbound plasma concentration		Total plasma concentration			Reference
	(ng/mL)		(ng/mL)			
	A	D	A	D	A + D	
Human	<0.0165	N.A.	<0.5	7.7	<8.2	Redfern, <i>et al.</i> , 2003 Vorperian, <i>et al.</i> , 1996
Common marmoset	0.247	1.15	31	61	92	-
Cynomolgus monkey	N.A.	N.A.	10	230	240	Ando, <i>et al.</i> , 2005
Beagle dog	N.A.	N.A.	13	15	28	Toyoshima, <i>et al.</i> , 2005

A: astemizole, D: desmethylastemizole, N.A.: Not available due to a lack of protein binding ratio data

4. 心電図パラメータ変化の各種心筋イオンチャネル阻害との相関

血漿中濃度を測定した時点について、各心電図パラメータ変化と、血漿中非タンパク結合型被験物質濃度と各心筋イオンチャネルに対する IC_{50} との比の相関を示す (Figure 3)。Desmethylastemizole は astemizole と同等の強い hERG 阻害活性を示すため、血漿中非結合型被験物質濃度として両化合物の合計値を用いた。結果、ヒトやその他の動物種での報告と同様に、QTc 延長、PR 延長および QRS 延長はそれぞれ hERG 阻害、Cav1.2 阻害および Nav1.5 阻害との強い相関が認められた。

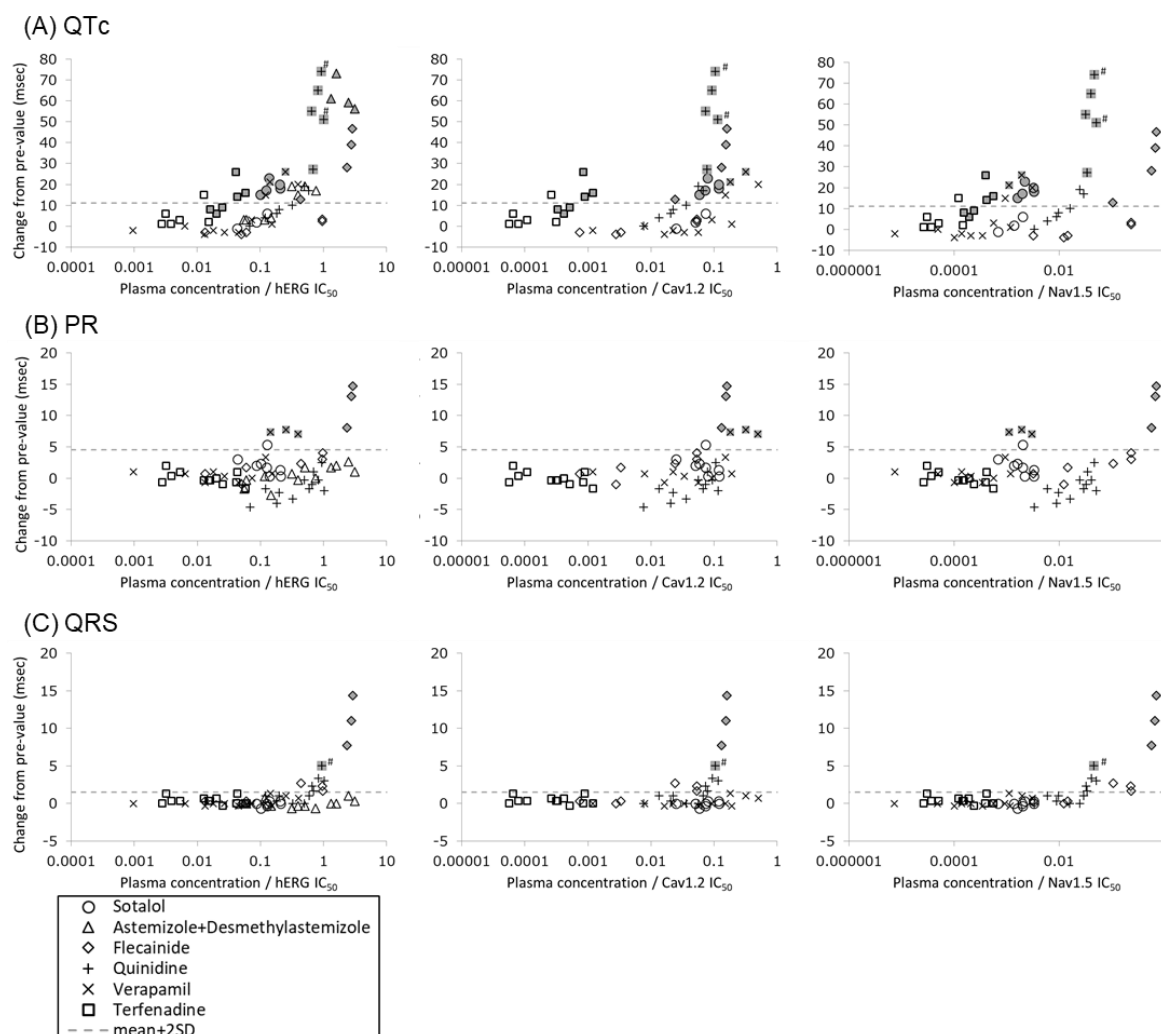


Figure 3 Relationship between ion channel inhibition and change in ECG parameters (QTc (A), PR (B), QRS (C)) in common marmoset.

X axis shows a ratio of unbound plasma concentration / IC_{50} for each cardiac ion channel and Y axis shows change from pre-value in QTc, PR interval and QRS duration. Astemizole+desmethylastemizole is not included for the relationship analysis with Cav1.2 and Nav1.5 because IC_{50} for Cav1.2 and Nav1.5 of desmethylastemizole have not been reported. The closed symbols represent significant changes from the corresponding vehicle control value. #: Judged as significant since the changes noted in 2 common marmosets exceeded the range of any vehicle control data, although the statistical analysis was not conducted.

結論

以上の結果から、覚醒無拘束下コモンマーモセットを用いた心電図評価は、医薬品候補化合物の臨床での心電図異常を予測することが可能であると考えられた。またコモンマーモセットは非常に小型な非齧歯動物であるため、従来のビーグルイヌやカニクイサルを用いた評価と異なり、創薬初期においても実施可能な、有用な評価であると考えられた。

マルチ心筋イオンチャネル阻害剤がヒト心電図に及ぼす影響のほとんどは、コモンマーモセットにおいても同等の血漿中曝露域において検出された。**Astemizole** による **QTc** 延長について、コモンマーモセットとヒトで感受性の差が示唆されたものの、一般的に非臨床評価に用いられるビーグルイヌ及びカニクイサルとは同程度の感受性であった。また、**QTc** 延長は **hERG** 阻害、**QRS** 延長は **Nav1.5** 阻害、**PR** 延長は **Cav1.2** 阻害との関与が示唆され、これらはヒトや動物における報告と同様であった。

投与前値からの変化量を用いて評価することで個体差の少ない評価が可能となり、また背景値を活用することで **n=3** の統計学的有意差検定以上の精度で被験物質の影響の有無を判定可能であることが示唆されたことから、本評価は例数の少ない場合でも評価精度が確保されることが期待される。コモンマーモセットにおいては小型動物に特徴的な体温低下が認められる可能性があり、それによってヒトへの外挿性の低い心電図異常が生じる可能性が示唆された。従って、同時に体温を測定し、心電図異常に対する体温変化の影響も合わせて評価することが、ヒト心電図への影響予測に重要であると考えられた。

審査結果の要旨

本研究では、小型な動物であるコモンマーモセットを用いた非臨床心電図評価のヒト心電図評価結果に対する予測性を、マルチ心筋イオンチャネル阻害薬の作用評価結果から検証した。心電図測手用の手術を施したコモンマーモセットに sotalol、astemizole、flecainide、quinidine、verapamil、terfenadine をそれぞれ経口投与し、覚醒非拘束下で心電図および血漿中被験物質濃度を測定した。その結果、臨床報告がある心電図異常は全て血中曝露依存的に検出された。コモンマーモセットでのみ認められた verapamil による QTc 延長は体温変化と良く相関したことから、小型動物に特徴的な変化である可能性が示された。また、Astemizole の QTc 延長作用に対するコモンマーモセットの低感受性が示唆されたが、イヌやサルと同程度の感受性であることが判明した。各心電図異常と心筋イオンチャネルの阻害度の相関性から、臨床報告と同様、QTc 延長、PR 延長および QRS 延長はそれぞれ hERG 阻害、Cav1.2 阻害および Nav1.5 阻害と良く相関することが判明した。

以上の研究成績は、コモンマーモセットを用いた心電図評価が医薬品候補化合物のヒト心電図への作用の予測に有用であり、より効果的な創薬研究に貢献する可能性が示された点で評価されるため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。